

令和元年6月7日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19154

研究課題名(和文) 走化性因子受容体の新たな制御因子の機能とその免疫系における役割

研究課題名(英文) The COMMD3/8 complex determines GRK6 specificity for chemoattractant receptors

研究代表者

中井 晶子 (Akiko, Nakai)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：80768862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、走化性因子受容体のシグナル伝達の新たな制御因子を探索し、COMMD8と同一機能未知のタンパクを同定した。COMMD8は同じタンパクファミリーに属するCOMMD3と複合体を形成し、走化性因子受容体と会合することを見出した。COMMD3/8複合体の欠損により、B細胞の走化性が低下し、抗体産生も減少することから、COMMD3/8複合体が液性免疫応答に重要であることが分かった。そのメカニズムを解析したところ、COMMD3/8複合体がGRK6というシグナル伝達分子を走化性因子受容体に動員するアダプター分子として機能することで、走化性因子受容体のシグナル伝達を促進することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、COMMD3/8複合体がGRK6を走化性因子受容体に動員するアダプター分子として機能することが明らかになり、走化性因子受容体のシグナル伝達の新たな制御メカニズムが示された。また、B細胞特異的にCOMMD3/8複合体を欠損するマウスでは、B細胞を介した免疫応答が低下することが分かった。このことから、COMMD3/8複合体の機能を阻害することにより、過剰な免疫応答によって引き起こされる自己免疫疾患やその他の炎症性疾患の病態が改善する可能性が示された。今後、COMMD3/8複合体はこれらの疾患の治療における新たな創薬のターゲットになり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lymphocyte migration is mediated by GPCRs that respond to chemoattractive molecules. After their activation, GPCRs are phosphorylated by different GRKs, which produces distinct functional outcomes through β -arrestins. However, the molecular machinery that targets individual GRKs to activated GPCRs remains elusive. Here, we identified copper metabolism MURR1 domain-containing (COMMD)8 as a protein that interacted with multiple chemoattractant receptors. COMMD8 was found to interact with COMMD3 of the same protein family (the COMMD3/8 complex). Deficiency of the COMMD8 or COMMD3 impaired B cell migration and humoral immune responses. We demonstrated that the COMMD3/8 complex selectively recruited GRK6 and induced GRK6-mediated phosphorylation of CXCR4 and activation of β -arrestin-mediated signaling. Thus, the COMMD3/8 complex functions as an adaptor that selectively recruits a specific GRK to chemoattractant receptors and represents a point of regulation for immune responses.

研究分野：免疫学

キーワード：免疫応答 GPCR 走化性因子受容体 細胞遊走

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

免疫系が機能する上で必要不可欠である秩序だったリンパ球の移動と配置は、主にケモカインに代表される走化性因子とそれらを認識する G タンパク共役型受容体 (G protein-coupled receptor, GPCR) によって制御されている。GPCR にリガンドが結合すると、G タンパクに媒介されるシグナルが惹起される一方で、その C 末端領域は GPCR kinase (GRK) によってリン酸化され、そこに β -arrestin が会合し、 β -arrestin に媒介されるシグナル伝達を開始される。GRK には 7 つのサブタイプが存在するが、それぞれが GPCR の C 末端領域の異なる部位をリン酸化し、その部位に応じて下流のシグナル伝達のアウトカムが決まる。しかし、どのようにして GPCR に対する GRK の選択性が決定されるのか、その分子メカニズムは不明であった。

申請者は GPCR の新たなシグナル伝達の制御因子を探索したところ、走化性因子受容体 CXCR4 の C 末端領域に会合するタンパクとして copper metabolism MURR1 domain-containing (COMMD)8 を同定した。COMMD タンパクファミリーは 10 種類のタンパクから構成され、その多くは転写因子 NF- κ B の負の制御因子であることが知られているが、COMMD8 の機能は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)走化性因子受容体をはじめとする GPCR のシグナル伝達、および(2)B 細胞を介した免疫応答における COMMD8 の役割を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 走化性因子受容体をはじめとする GPCR のシグナル伝達における COMMD8 の役割

COMMD8 が COMMD タンパクファミリーの他のタンパクと会合するかどうか共免疫沈降法により確かめる。また、COMMD8 の細胞内における局在を共焦点顕微鏡を用いて確認する。さらに、COMMD8 が CXCR4 以外の走化性因子受容体とも会合するかどうか共免疫沈降法によって検討する。

COMMD8 の生理的な機能を明らかにするために、COMMD8 を欠損するマウスを作製し、解析を行う。トランスウェルを用いた走化性試験を行い、COMMD8 の欠損が B 細胞の走化性にどのような影響を与えるか、CXCR4 を含めた複数の走化性因子受容体の反応性について検討する。

COMMD8 がどのように走化性因子受容体のシグナル伝達を制御しているか明らかにするために、GRK および β -arrestin に着目した解析を行う。COMMD8 の欠損によって、CXCR4 への GRK と β -arrestin の動員がどのように変化するか、免疫沈降法により検討する。また、COMMD8 が GRK による CXCR4 のリン酸化に関与するか、それぞれの GRK によるリン酸化部位を特異的に認識する抗体を用いて検討する。

COMMD8 がどのように走化性因子受容体と会合するか調べるために、Tango アッセイを用いた解析を行う (図 1)。C 末端側に tobacco etch virus (TEV) protease を付加した COMMD8 と、TEV 認識配列と tetracycline-controlled transcriptional activator (tTA) を付加した CXCR4 を、tTA 反応型ルシフェラーゼ遺伝子を発現している HTL 細胞に導入する。CXCR4 と COMMD8 が会合すると、TEV によって CXCR4 側の tTA が遊離し、ルシフェラーゼが発現する。つまり、CXCR4 と COMMD8 の会合をルシフェラーゼの発光として測定し、評価できる。CXCR4 の C 末端部分の欠失変異体を作製し、Tango アッセイを行うことで、COMMD8 との会合に CXCR4 の C 末端領域のどの部分が必要か検討する。

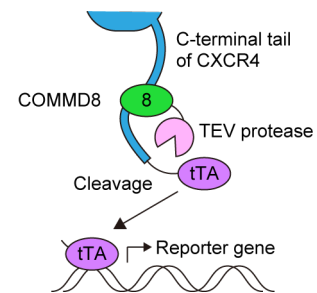


図 1. Tango アッセイ

(2) B 細胞を介した免疫応答における COMMD8 の役割

B 細胞を介した免疫応答において COMMD8 がどのような役割を果たしているか明らかにするために、B 細胞特異的に COMMD8 を欠損する Mb1-Cre⁺ *Commd8*^{fllox/fllox} マウスをモデル抗原 NP-CGG で免疫し、血清中の抗体価を ELISA により測定する。また、同マウスの胚中心 B 細胞と形質芽細胞の数をフローサイトメトリーで解析する。さらに、COMMD8 を欠損する B 細胞のリンパ組織における局在が、野生型 B 細胞とどのように異なるか組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1) COMMD3/8 複合体の形成と走化性因子受容体への会合

申請者は COMMD8 が、COMM ドメインを介して同じタンパクファミリーに属する COMMD3 と会合し、COMMD3/8 複合体を形成することを見出した。また、COMMD3/8 複合体は細胞質に局在するが、CXCR4 の刺激によって細胞膜へ移動し、CXCR4 と共局在するこ

とが分かった。さらに、COMMD3/8 複合体は CXCR4 以外の複数の走化性因子受容体 (CXCR5、CCR7 および EBI2) にもリガンド刺激依存的に会合することが確認された。

COMMD3 あるいは COMMD8 を全身で欠損するマウスは胎生初期に死亡するため、B 細胞特異的に COMMD3 あるいは COMMD8 を欠損するマウスを作製し、COMMD3/8 複合体の生理的な機能について検討した。興味深いことに、COMMD3 を欠損する B 細胞では、COMMD8 タンパクはほとんど検出されなかった。同様に、COMMD8 欠損 B 細胞では、野生型 B 細胞に比べて COMMD3 タンパクの発現が大きく減少した。一方、COMMD8 および COMMD3 の mRNA の発現は野生型細胞と変わらなかった。CRISPR/Cas9 システムを用いて COMMD3 と COMMD8 の欠損細胞をそれぞれ作製し解析したところ、COMMD3 および COMMD8 は互いの非存在下ではユビキチン化が亢進し、プロテアソームを介して分解されることが分かった。このことから、COMMD3/8 複合体の安定性が両タンパク間の会合に依存することが明らかになった。

(2) 走化性因子受容体のシグナル伝達における COMMD3/8 複合体の役割

トランスウェルを用いた走化性試験を行ったところ、COMMD3 あるいは COMMD8 を欠損する B 細胞では CXCR4 以外にも CXCR5、CCR7 および EBI2 の反応性が減少した。このことから COMMD3/8 複合体は複数の走化性因子受容体の正の制御因子であることが分かった。この結果と一致して、B 細胞特異的に COMMD3 あるいは COMMD8 を欠損するマウスでは、CXCR5 を介したリンパ濾胞への B 細胞の局在や、CXCR4 および CCR7 に媒介されるリンパ節への B 細胞の進入が減少した。以上のことから、COMMD3/8 複合体が生体内における B 細胞の移動と配置に重要であることが明らかになった。

(3) B 細胞を介した免疫応答における COMMD3/8 複合体の役割

免疫応答の初期において、活性化 B 細胞は EBI2 を介してリンパ濾胞の外側へ移動する。また、EBI2 を介したシグナル伝達は抗体産生に重要であることが分かっている。B 細胞特異的に COMMD3 あるいは COMMD8 を欠損するマウスをモデル抗原で免疫したところ、EBI2 欠損マウスと同様に、COMMD3/8 複合体を欠損することによって、B 細胞のリンパ濾胞の外側への移動が妨げられることを見出した (図 2-A)。また、この移動の異常に伴って、COMMD3/8 複合体の欠損により免疫後の抗体産生が低下し (図 2-B)、抗原特異的胚中心 B 細胞および形質芽細胞の産生も減少することが分かった。以上のことから、COMMD3/8 複合体が B 細胞を介した免疫応答に重要であることが明らかになった。

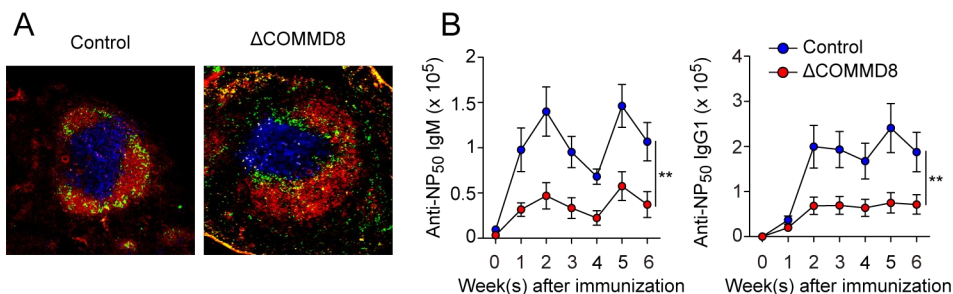


図 2. COMMD3/8 複合体の免疫応答における役割 (A)免疫後 3 時間のマウスの組織像。活性化 B 細胞 (緑)、リンパ濾胞 (赤)、T 細胞領域 (青)。野生型の活性化 B 細胞はリンパ濾胞の外側に移動するのに対して、COMMD8 欠損活性化 B 細胞は T 細胞領域に移動する。(B)B 細胞特異的に COMMD8 を欠損するマウスでは免疫後の抗体産生が低下する。

(4) CXCR4 の β -arrestin に媒介されるシグナル伝達への COMMD3/8 複合体の関与

COMMD3/8 複合体がどのように走化性因子受容体のシグナル伝達を制御しているか、CXCR4 をモデルとして用いて検討した。COMMD3/8 複合体が GPCR の G タンパクに媒介されるシグナル伝達経路に関与するか調べるために、Gai の活性化やカルシウムの流入について検討したところ、COMMD3/8 複合体の欠損による影響は認められなかった。このことから、COMMD3/8 複合体は CXCR4 の G タンパクに媒介されるシグナル伝達経路に関与しないことが示唆された。一方で、COMMD3/8 複合体を欠損する細胞では、CXCR4 への β -arrestin-2 の会合が低下し、その下流の MAPK の活性化が減少することが分かった。以上のことから、COMMD3/8 複合体が CXCR4 の β -arrestin-2 に媒介されるシグナル伝達を促進することが明らかになった。

(5) GRK6 の機能における COMMD3/8 複合体の役割

CXCR4 の C 末端領域は GRK2、GRK3 および GRK6 によってリン酸化される。COMMD3/8 複合体の欠損がそれぞれの GRK による CXCR4 のリン酸化に影響するかどうか検討したところ、COMMD3 あるいは COMMD8 欠損 B 細胞で GRK6 を介した CXCR4 のリン酸化が消失

することを見出した。一方で、GRK2 および GRK3 による CXCR4 のリン酸化にはほとんど影響しなかった。また、COMMD3/8 複合体は GRK6 に特異的に結合し、GRK6 の CXCR4 への会合を促進することが分かった。以上のことから、COMMD3/8 複合体が GRK6 を CXCR4 へ動員するアダプター分子として機能し、GRK6 による CXCR4 のリン酸化を促進することが明らかになった。

(6) COMMD3/8 複合体の作用メカニズム

COMMD3/8 複合体がどのようにして CXCR4 と会合するか Tango アッセイを用いて検討したところ、CXCR4 の C 末端領域の GRK2 および GRK3 によってリン酸化される部位を欠失した変異体では、COMMD3/8 複合体と CXCR4 の会合が減少することが分かった。また、GRK2 の機能阻害剤の添加により COMMD3/8 複合体と CXCR4 の会合が減少した。これらの結果と一致して、GRK2 および GRK3 によってリン酸化されるセリンをアラニンに置換した CXCR4 変異体においても、COMMD3/8 複合体と CXCR4 の会合が減少することが確認された。以上のことから、COMMD3/8 複合体の CXCR4 への会合には GRK2 および GRK3 によるリン酸化が必要であることが明らかになった (図 3)。

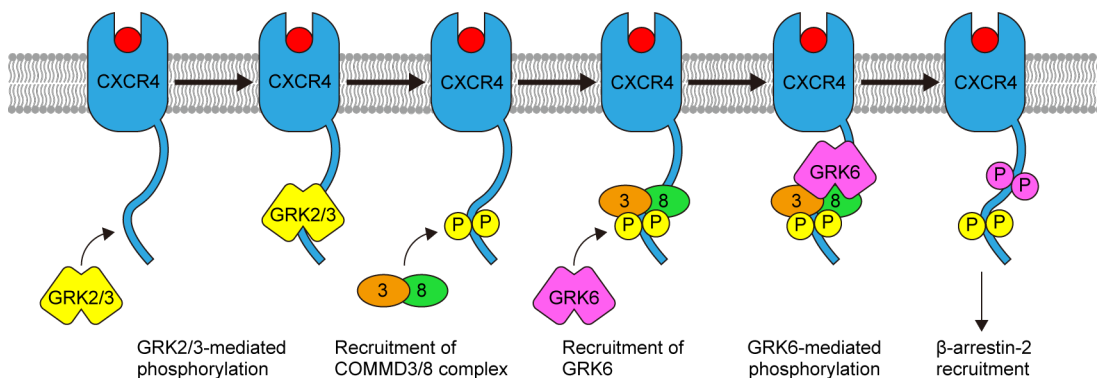


図 3. COMMD3/8 複合体の作用メカニズム：GRK2 および GRK3 によってリン酸化された CXCR4 の C 末端領域に COMMD3/8 複合体は会合する。COMMD3/8 複合体は GRK6 を CXCR4 に動員するアダプター分子として機能し、GRK6 による CXCR4 のリン酸化を促すことで、β-arrestin を介したシグナル伝達を促進し、リンパ球の遊走が亢進する。

(7) β₂ アドレナリン受容体における COMMD3/8 複合体の役割

COMMD3/8 複合体は走化性因子受容体以外の GPCR のシグナル伝達にも関与している可能性があるため、最も代表的な GPCR の一つである β₂ アドレナリン受容体のシグナル伝達において COMMD3/8 複合体がどのような役割を果たすか検討した。リガンド刺激によって、COMMD3/8 複合体が β₂ アドレナリン受容体に会合することが見出された。また、COMMD3/8 複合体欠損細胞では、GRK6 による β₂ アドレナリン受容体のリン酸化が消失し、β₂ アドレナリン受容体への β-arrestin-2 の会合と MAPK の活性化が減少することが明らかになった。さらに CXCR4 と同様に、β₂ アドレナリン受容体への COMMD3/8 複合体の会合には GRK2 によるリン酸化が必要であることが分かった。以上のことから、COMMD3/8 複合体は β₂ アドレナリン受容体においても GRK6 のアダプター分子として機能し、β-arrestin を介したシグナル伝達を促進することが示唆された。このことは、COMMD3/8 複合体が走化性因子受容体だけではなく、幅広い GPCR のシグナル伝達において GRK6 のアダプター分子として機能する可能性を示唆している。

本研究により、COMMD8 は COMMD3 と複合体を形成し、両タンパク間の会合が互いの安定性に必要であることが見出された。COMMD3/8 複合体は GRK2 および GRK3 によってリン酸化された GPCR の C 末端領域に会合し、GRK6 を GPCR に動員するアダプター分子として機能して、β-arrestin を介した MAPK の活性化と細胞遊走を促進することが明らかになった (図 3)。さらに、COMMD3/8 複合体は B 細胞を介した免疫応答に重要な役割を果たすことが分かった。

GPCR の C 末端領域は複数の GRK によってそれぞれ異なる部位がリン酸化され、その部位に応じて下流のシグナル伝達のアウトカムが決定する。しかし、どのようにして GPCR に対する GRK の選択性が決定されるのか不明であった。本研究により、COMMD3/8 複合体が GRK6 を GPCR へ動員するアダプター分子として機能することが明らかになり、GPCR のシグナル伝達の新たな制御メカニズムが示された。

COMMD3/8 複合体の安定性は両タンパク間の会合に依存することから、COMMD3 および COMMD8 間の会合を阻害することにより、COMMD3/8 複合体の機能を喪失させ得ると考えられる。COMMD3/8 複合体は B 細胞を介した免疫応答を促進することから、その機能阻害剤

は過剰な免疫応答によって引き起こされる自己免疫疾患や、その他の炎症性疾患の病態を改善させる可能性があり、COMMD3/8 複合体は新たな創薬のターゲットになり得る。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

中井 晶子、藤本 潤、宮田 治彦、Ralf Stumm、檜崎 雅司、Stefan Schulz、馬場 義裕、熊ノ郷 淳、鈴木 一博、The COMMD3/8 complex determines GRK6 specificity for chemoattractant receptors. *J. Exp. Med.* 2019 DOI: 10.1084/jem.20181494 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 中井 晶子. 「The COMMD3/8 complex dictates the specificity of GRK recruitment to chemoattractant receptors」, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 福岡国際会議場, 2018 年 12 月 10 日.

(2) 中井 晶子. 「The COMMD3/8 complex dictates the specificity of GRK recruitment to chemoattractant receptors」, 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2018 年 11 月 28 日.

〔その他〕

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 免疫応答ダイナミクス研究室 ホームページ
<http://ird.ifrec.osaka-u.ac.jp/research>

6 . 研究組織